

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 3 年 1 1 月 2 1 日  
Date of Application:

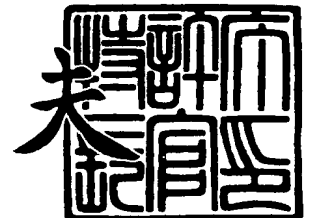
出 願 番 号                      特 願 2 0 0 3 - 3 9 2 6 7 9  
Application Number:  
[ST. 10/C]:                      [ J P 2 0 0 3 - 3 9 2 6 7 9 ]

出      願      人                      コニカミノルタエムジー株式会社  
Applicant(s):

2 0 0 4 年    2 月 1 6 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願  
【整理番号】 PH00092  
【提出日】 平成15年11月21日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 A61K 9/127  
A61K 49/04  
A61K 49/00

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都新宿区西新宿一丁目2 6 番2 号 コニカミノルタエムジー株式会社内  
【氏名】 上田 栄一

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都新宿区西新宿一丁目2 6 番2 号 コニカミノルタエムジー株式会社内  
【氏名】 中島 彰久

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都新宿区西新宿一丁目2 6 番2 号 コニカミノルタエムジー株式会社内  
【氏名】 長池 千秋

【特許出願人】  
【識別番号】 303000420  
【氏名又は名称】 コニカミノルタエムジー株式会社

【代理人】  
【識別番号】 100081994  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 鈴木 俊一郎

【選任した代理人】  
【識別番号】 100103218  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 牧村 浩次

【選任した代理人】  
【識別番号】 100110917  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 鈴木 亨

【選任した代理人】  
【識別番号】 100115392  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 八本 佳子

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 014535  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 要約書 1  
【包括委任状番号】 0304877

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

中心粒径が50～200nmであるリポソームを含み、  
該リポソームは実質的に1枚の脂質膜を有し、該膜内の水相と該リポソームが分散されている水性媒体との両方にヨウド系化合物および製剤助剤を含有し、  
該膜内外でそれぞれの濃度が実質的に同一であることを特徴とするX線検査用造影剤。

**【請求項 2】**

前記製剤助剤が、少なくとも水溶性アミン系緩衝剤および／またはキレート剤であることを特徴とする請求項1に記載のX線検査用造影剤。

**【請求項 3】**

前記リポソームに封入された前記ヨウド系化合物が、全ヨウド系化合物の5～25%で含まれていることを特徴とする請求項1または2に記載のX線検査用造影剤。

**【請求項 4】**

前記リポソームに封入された前記ヨウド系化合物が、脂質膜重量に対して、3～8の重量比であることを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載のX線検査用造影剤。

**【請求項 5】**

前記リポソームの脂質膜にポリアルキレンオキシド修飾リン脂質および／またはステロール類を含有することを特徴とする請求項1～4に記載のX線検査用造影剤。

**【請求項 6】**

前記リポソームが、超臨界二酸化炭素法により作製されたりポソームであることを特徴とする、請求項1～5のいずれかに記載のX線検査用造影剤。

**【請求項 7】**

前記リポソームが、0.1～0.4 $\mu$ の孔径を有する濾過膜を通されていることを特徴とする請求項1～6のいずれかに記載のX線検査用造影剤。

**【請求項 8】**

リポソーム膜の成分としてリン脂質とともに、必要に応じてポリアルキレンオキシド修飾リン脂質および／またはステロール類を超臨界二酸化炭素に溶解した後、少なくともヨウド系化合物および製剤助剤を含む水溶液を導入することによりミセルを形成させ、次いで水を加えてから二酸化炭素を排出し、さらに形成されたりポソームを0.1～0.4 $\mu$ の孔径を有する濾過膜を通し、最終的にヨウド系化合物および製剤助剤が該膜内外でそれぞれ実質的に同一濃度で含有されるリポソームを作製することを特徴とする、請求項1～7のいずれかに記載のX線検査用造影剤の製造方法。

**【書類名】明細書****【発明の名称】リポソーム含有 X 線検査用造影剤****【技術分野】****【0 0 0 1】**

本発明は、非経口 X 線検査用造影剤に関し、詳しくは内部に造影物質を内包したリポソームを含む X 線検査用造影剤に関する。

**【背景技術】****【0 0 0 2】**

X 線単純撮影や C T 撮影法（コンピュータ断層撮影法）は、今日の画像診断の中核をなしている。骨、歯などのいわゆる硬組織は X 線を良好に吸収するために容易に高コントラスト像を得ることができる。これに対し、軟組織間では X 線吸収の差が小さいため高いコントラスト像を得ることは困難である。このような場合、コントラストの高い像を得るために造影剤を使用することが一般に行なわれている。

**【0 0 0 3】**

現在実用化されている X 線造影剤の大部分は、トリヨードフェニル基を含有し水溶性化した化合物を造影物質とするものである。これらの造影剤は、血管、尿管、輸卵管などの管腔部位に投与され、管腔の形状、狭窄などの診断に使用されている。しかしながら、これらの化合物は組織や疾患部位と相互作用をすることなく管腔部位から速やかに排出されるために、組織や疾患部位、特に癌組織をより詳細に診断する目的には役立たない。このため目標とする組織もしくは疾患部位に選択的に集積し、その周囲またはその他の部位と明瞭なコントラストで区別できる画像を提供する X 線造影剤が望まれている。そのような X 線検査用造影剤であれば、微細な癌組織であっても精度良く検出することが可能となる。腫瘍発見のために開発された検査方法としては、X 線撮影法だけでなく測定原理を異にする他の方法も開発されている。たとえば M R I（磁気共鳴造影法）では、癌組織、特に微小な癌組織を精度よく撮像するには感度の面から限界があり、P E T（陽電子放射断層撮影法）では、被爆と稼動コストの点で一般的でなく、いずれも大規模な設備と高額な装置を必要としており、今のところ一般的に広く利用される検査法ではない。

**【0 0 0 4】**

国際公開 W O 98/46275、同 W O 95/31181、同 W O 94/19025、同 W O 96/28414、同 W O 96/00089、米国特許 4873075 号、同 4567034 号などには、疎水性ヨウド化合物を界面活性剤や油脂の存在下で水中に分散させ、腫瘍、肝臓、脾臓、副腎皮質、動脈硬化巣、血管プール、リンパ系などを造影する方法が開示されている。これらの方法では、造影剤を微粒化するにより体内での滞留時間を長くして疾患部位を選択的に造影しようとするものである。しかしながら、その目的のために提案された製剤方法は、造影の効率および選択性とも充分でない。さらに使用するヨウド化合物が疎水性であるために、造影後に体外へ排出する速度が遅く、患者への負担が大きいという問題点もある。

**【0 0 0 5】**

一方、造影剤を微粒子状にする方法として、生体膜類似の脂質から構成され、低い抗原性のために安全性が高いとされているリポソームに造影性化合物を内包させる手法も検討されている。たとえば国際公開 W O 88/09165、同 W O 89/00988、同 W O 90/07491、特開平 07-316079、特開 2003-5596 では、イオン性または非イオン性の造影剤を含有するリポソームが提案されている。これらの方法では、素材としての安全性が高く、生体内で適度な分解性を有するリポソームを用いるにもかかわらず、製造過程においてリポソーム膜を構成するリン脂質の溶剤として、有機溶媒、特にクロロホルム、ジクロロメタンといったクロル系溶剤を使用する。したがって、どうしても残存する溶剤の毒性があるという理由で実用化に至っていない（たとえば、特許文献 1 参照）。

**【0 0 0 6】**

他方、脂質可溶性の薬剤は容易にリポソーム中に封入されるが、その封入量は他の要因にも左右されることから必ずしもそれほど多くはない。また水溶性電解質である薬剤は、その薬剤の電荷と荷電した脂質の電荷との相互作用を通じてリポソーム内部の水相に封入

できるが、薬剤が水溶性の非電解質である場合には、そうした手段を採ることはできない。X線造影剤についても、一般にイオン性造影化合物よりも、実質的に毒性の低い非イオン性ヨウド化合物をリポソーム内に封入することが望まれるが、上記の理由から容易ではない。さらに形成されたりポソームは多重層になりやすく、ヨウド化合物の内包率も低いために効率が悪くなる。このような水溶性の非電解質を効率的にリポソーム中に封入する手段として、逆相蒸発法、エーテル注入法が挙げられるが、有機溶剤を使用するためにやはり安全性の問題が残る。

#### 【0007】

特開2003-119120（特許文献2）では、リポソームを含有する化粧品、皮膚外用剤を、超臨界二酸化炭素を用いて製造する方法が開示されており、親水性薬効成分や親油性薬効成分をリポソームに内包する皮膚外用剤の製造例が示されている。しかし、親水性薬効成分として、水溶性電解質の例は示されているが、同法により水溶性非電解質をリポソームに効率よく内包できるか不明であった。

#### 【0008】

首尾良く造影物質をリポソーム内部に内包させても、時間経過とともに外部へ漏出する問題、あるいはリポソームそのものが不安定となる事態も考慮されねばならない。さらにリポソームを生体内へ投与しても、その多くが肝臓、脾臓などの網内系組織で捕捉されるため、所期の効果が得られないことも指摘されている（Cancer Res., 43, 5328(1983)）。結局、単回の少量投与で、多くの有益な生体情報が得られる使い勝手の良いX線検査用造影剤が望まれている。

【特許文献1】特開平7-316079号公報

【特許文献2】特開2003-119120号公報

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0009】

本発明は、造影物質のマイクロキャリアとしてその保持効率を高めたりポソームを使用することにより、造影の効率および選択性が高くしかも腫瘍描出性が良好なX線検査用造影剤を提供することを目的とする。より具体的には毒性のある有機溶媒を使用することなく狭い粒径範囲のリポソーム内に水溶性ヨウド系化合物を封入した、微小な癌組織の検出にも優れるX線造影剤を提供することを目的とする。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0010】

上記課題を解決する本発明は、以下の構成を有する。

#### 【0011】

本発明は、中心粒径が50～200nmであるリポソームを含み、該リポソームが実質的に1枚の脂質膜を有し、該膜内の水相と該リポソームが分散されている水性媒体との両方にヨウド系化合物および製剤助剤を含有し、該膜内外でそれぞれの濃度が実質的に同一であることを特徴とするX線検査用造影剤である。

#### 【0012】

前記製剤助剤は、少なくとも水溶性アミン系緩衝剤および／またはキレート剤であることを特徴としている。

#### 【0013】

前記リポソームに封入された前記ヨウド系化合物が、全ヨウド系化合物の5～25質量%で含まれていることが好ましい。

#### 【0014】

さらに前記リポソームに封入された前記ヨウド系化合物が、脂質膜重量に対して、3～8の重量比であることが好ましい。

#### 【0015】

本発明のX線検査用造影剤は、前記リポソームの脂質膜にポリアルキレンオキシド修飾リン脂質および／またはステロール類を含有する。

## 【0016】

前記リポソームは、超臨界二酸化炭素法により作製されたりポソームである。

## 【0017】

さらに前記リポソームが、 $0.1\sim 0.4\mu$ の孔径を有する濾過膜を通して行われていることが好ましい。

## 【0018】

本発明のX線検査用造影剤の製造方法は、リポソーム膜の成分としてリン脂質とともに、必要に応じてポリアルキレンオキシド修飾リン脂質および／またはステロール類を超臨界二酸化炭素に溶解した後、少なくともヨウド系化合物および製剤助剤を含む水溶液を導入することによりミセルを形成させ、次いで水を加えてから二酸化炭素を排出し、さらに形成されたりポソームを $0.1\sim 0.4\mu$ の孔径を有する濾過膜を通し、最終的にヨウド系化合物および製剤助剤が該膜内外でそれぞれ実質的に同一濃度で含有されるリポソームを作製することを特徴としている。

## 【0019】

〔発明の具体的説明〕

上記のように本発明のX線検査用造影剤は、狭い粒径範囲に揃えたりポソームを含む。そのリポソームは実質的に1枚の脂質膜を有し、該膜内の水相と該リポソームが分散されている水性媒体との両方にヨウド化合物および製剤助剤を含有し、該膜内外でそれぞれの濃度が実質的に同一となっている。本発明の造影剤はこの構成によりリポソームの安定化とヨウド化合物の保持安定性を図るとともに、造影化合物の血中滞留性を高めている。これにより造影物質の効率的送達ならびに良好なターゲティングを達成することができる。結果として本造影剤は優れた腫瘍描出性を実現し、X線造影による診断的検査の精度を高めることが可能となった。以下、本発明を造影化合物、リポソーム、X線検査用造影剤の順に詳細に説明する。

## 【0020】

造影化合物

本発明における水溶性ヨウド系化合物は、造影性があればイオン性、非イオン性を問わず特に規定されない。一般的に非イオン性ヨウド化合物の方が、イオン性ヨウド化合物よりも浸透圧が低くより望ましい。水溶性の非イオン性ヨウド系化合物として、ヨウ化フェニルを含み、たとえば2,4,6-トリヨードフェニル基を少なくとも1個有する非イオン性ヨウド化合物が好適である。

## 【0021】

具体的には、そのような非イオン性ヨウド化合物として、イオヘキソール、イオペンツール、イオジキサノール、イオプロミド、イオトロラン、イオメプロール、N,N'-ビス〔2-ヒドロキシ-1-(ヒドロキシメチル)-エチル〕-5-〔〔(2-ヒドロキシ-1-オキソピリル)-アミノ〕-2,4,6-トリヨード-1,3-ベンゼンジカルボキシアミド(イオパミドール)；メトリザミドなどが挙げられる。

## 【0022】

その他のヨウド系化合物として、ジアトリゾイン酸；ジアトリゾエートナトリウム；メグルミンジアトリゾエート；アセトリゾイン酸およびその可溶性塩；ジプロトリゾ酸；ヨードミド，ヨージパミドナトリウム，メグルミンヨージパミド，ヨード馬尿酸およびその可溶性塩；ヨードメタム酸；ヨードピラセトヨード-2-ピリドン-N-酢酸，3,5-ジヨード-4-ピリドン-N-酢酸(ヨードピラセト)；前記酸のジエチルアンモニウム塩；イオタラム酸；メトリゾイン酸およびその塩；イオパノ酸、イオセファム酸、イオフェノ酸およびそれらの可溶性塩；チロパノエートナトリウム、イオポダートナトリウムおよび他の同様なヨウ素化された化合物などを挙げるができる。

## 【0023】

これらの化合物は単独で用いてもよく、あるいは2種以上を組み合わせ用いてもよい。またその例示に限定されるものではない。なお本明細書において、化合物は遊離形態の他に、その塩、水和物なども含めて言及することができる。

## 【0024】

本発明のX線検査用造影剤に好適なヨウド系化合物として、高度に親水性であり、かつ高濃度でも浸透圧が高くないイオメプロール、イオパミドール、イオトロラン、イोजキサノールなどが挙げられる。特にイオトロラン、イोजキサノールといった二量体非イオン性ヨウド化合物では、同一ヨウド濃度の造影剤を調製しても全体のモル数が低いために浸透圧をさらに低下させる利点がある。

## 【0025】

本発明の造影剤における水溶性ヨウド系化合物の濃度は、造影化合物の性質、意図する製剤の投与経路および臨床上の指標といった要因に基づき任意に設定することができる。リポソーム内に封入されたヨウド系化合物の量は、典型的にはX線造影剤における全ヨウド化合物の5～95質量%、好ましくは5～90質量%、より好ましくは5～70質量%である。特にヨウド化合物をカプセル化したリポソームの不安定化を防止するには、リポソーム内に封入されたヨウド系化合物の量は、全ヨウド化合物の5～25質量%、好ましくは5～20質量%であることが望ましい。X線検査用造影剤において、リポソーム内部に全体の5～25質量%（または5～20質量%）の割合で封入されたヨウド化合物であれば、残り75～95質量%（または80～95質量%）が存在するリポソーム外の水性分散液へ流出する量は実質的に無視できる。したがって、ヨウド化合物をカプセル化したリポソームの浸透圧効果による不安定化を十分に防止でき、リポソームにおける造影物質の保持安定性は向上する。

## 【0026】

リポソーム

本発明のX線検査用造影剤は、上記造影化合物を目標とする臓器、組織などといった標的部位へ選択的に効率よく送達するために、マイクロキャリアとしてのリポソーム内に封入した形態で使用される。本発明の造影剤は、造影物質の保持効率が改善されたりリポソームを用いることにより血中滞留性を向上させて、効率的な薬物送達ならびにターゲティングの実現を図っている。特に優れた腫瘍描出性を獲得するために有効とされるEPR（Enhanced permeability and retention、透過性の亢進および滞留）効果を生じさせるためには、リポソーム構造の安定化および封入物質の保持安定性という表裏をなす保持効率を改善させた上で、血中安定性、血中滞留性といった特性を有することが求められる。

## 【0027】

本発明のX線造影剤は、造影化合物を内包するリポソームの粒径およびその二分子膜を適切に設計することによりターゲティング機能を実現することができる。そのためには受動的ターゲティングおよび能動的ターゲティングいずれも考慮される。前者は、リポソームの粒径、脂質組成、荷電などの調整を通じてその生体内挙動を制御することができる。リポソーム粒径を狭い範囲に揃える調整は、後述する方法に基づき容易に行われる。リポソーム膜表面の設計は、リン脂質の種類、組成および混在物質を変えることにより所望の特性を付与することができる。

## 【0028】

造影剤のより高度な集積性と選択性を可能とする能動的ターゲティングの採用もまた検討されるべきである。一例として、リポソーム表面にポリアルキレンオキシド高分子鎖またはポリエチレングリコール（PEG）を導入することは、標的部位までの誘導過程を制御し得るため、極めて有益である。本発明のX線造影剤に好適なリポソームとは、その表面にポリアルキレンオキシドまたはPEGを付加する修飾を施す結果、その血中滞留性が一層高められ、肝臓などの細網内皮系細胞に貪食されにくいリポソームである。癌組織、疾患部位などに到達しなかったX線造影剤は、正常部位に集積することなく、副作用が発現する前にリポソームが分解されて体外に排泄される。このことはリポソームを設計する際にその安定性を体外排出時間との関係で適切にコントロールすることにより可能である。造影物質は水溶性のヨウド系化合物を使用するため、腎臓を経由して速やかに尿中に排泄される。そのため徒に体内に留まることによる弊害、遅発性の副作用などを防止できる。

## 【0029】

本X線造影剤の送達システムに使用されるリポソームの設計、製造方法について、以下に詳述する。

#### 【0030】

リポソームは、通常、脂質二重膜から形成されている。その脂質膜の成分として、一般にリン脂質および／または糖脂質が好ましく使用される。

#### 【0031】

本発明のリポソームにおける好ましい中性リン脂質として、大豆、卵黄などから得られるレシチン、リゾレシチンおよび／またはこれらの水素添加物、水酸化物の誘導体を挙げることができる。

#### 【0032】

その他のリン脂質として、卵黄、大豆またはその他の動植物に由来するか、または半合成のホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴミエリン、合成により得られるホスファチジン酸、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、ジミリストリルホスファチジルコリン (DMPC)、ジオレイルホスファチジルコリン (DOPC)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG)、ジステアロイルホスファチジルセリン (DSPS)、ジステアロイルホスファチジルグリセロール (DSPG)、ジパルミトイルホスファチジルイノシトール (DPPI)、ジステアロイルホスファチジルイノシトール (DSPI)、ジパルミトイルホスファチジン酸 (DPPA)、ジステアロイルホスファチジン酸 (DSPA) などを挙げることができる。

#### 【0033】

これらのリン脂質は通常、単独で使用されるが、2種以上併用してもよい。ただし2種以上の荷電リン脂質を使用する場合には、負電荷のリン脂質同士または正電荷のリン脂質同士で使用する事が、リポソームの凝集防止の観点から望ましい。中性リン脂質と荷電リン脂質を併用する場合、重量比として通常、200:1~3:1、好ましくは100:1~4:1、より好ましくは40:1~5:1である。

#### 【0034】

糖脂質としては、ジガラクトシルジグリセリド、ガラクトシルジグリセリド硫酸エステルなどのグリセロ脂質、ガラクトシルセラミド、ガラクトシルセラミド硫酸エステル、ラクトシルセラミド、ガングリオシドG7、ガングリオシドG6、ガングリオシドG4などのスフィンゴ糖脂質などを挙げることができる。

#### 【0035】

上記脂質の他にリポソームの膜構成成分として、必要に応じ他の物質を加えることもできる。たとえば膜安定化剤として作用するコレステロール、βヒドロコレステロール、コレステロールエステル、フィトステロール、シトステロール、スチグマステロール、カンペステロール、コレスタノール、ラノステロールまたは2,4-ジヒドロラノステロールなどのステロール類などが挙げられる。また1-オーステロールグルコシド、1-オーステロールマルトシドまたは1-オーステロールガラクトシドといったステロール誘導体もリポソームの安定化に効果があることが示されている(特開平5-245357号公報) ステロール類の使用量として、リン脂質1モルに対して0.01~0.5モル、好ましくは0.05~0.1モルの割合が望ましい。0.01モルより少ないと混合脂質の分散性を向上させるといふステロールの安定化作用が発揮されず、0.5モルより多すぎるとリポソームの形成が阻害されるか、形成されても不安定となる。

#### 【0036】

リポソーム膜中のコレステロールは、ポリアルキレンオキシド導入用のアンカーにもなり得る。具体的には、リポソーム膜構成成分として膜中に含めるコレステロールには、必要に応じリンカーを介してその先にポリアルキレンオキシド基を結合させてもよい。リンカーには、短鎖のアルキレン基、オキシアルキレン基などを用いる。特開平09-3093号公報には、ポリオキシアルキレン鎖の先端に、効率よく種々の「機能性物質」を共有結合により固定化することができ、リポソームの形成成分として利用することができる新規なコ



レステロール誘導体が開示されている。

【0037】

他に添加できる化合物として、負荷電物質であるジセチルホスフェートといったリン酸ジアルキルエステルなど、正電荷を与える化合物としてステアシルアミンなどの脂肪族アミンが例示される。

【0038】

本発明では、ポリアルキレンオキシド (PAO) 基または類似の基を有するリン脂質または化合物を X 線造影剤の意図する目的のためにリポソーム膜の一成分として使用する。細網内皮系細胞で捕捉されてしまう問題ならびに崩壊、凝集などといったリポソーム自体の不安定性に関する問題を解決する方法として、これまでリポソームの表面に高分子鎖であるポリエチレングリコール (PEG) 鎖、すなわち  $(CH_2CH_2O)_n-H$  を導入することが試みられている (たとえば、特開平 1-249717 号公報、FEBS letters, 268, 235(1990))。

【0039】

ポリアルキレンオキシド鎖 (ポリオキシアルキレン鎖) または PEG 鎖をリポソーム表面に付けることにより、新たな機能を該リポソームに付与することができる。たとえば、PEG 化リポソームには免疫系から認識されにくくなる (いわゆる「ステルス化」された状態である) 効果が期待できる。あるいはリポソームが親水的傾向を有することにより血中安定性を増して、長時間にわたり血液中の濃度を維持できることが明らかになっている (Biochim. Biophys. Acta., 1066, 29-36(1991))。

【0040】

これらの性質を利用して X 線造影剤に臓器特異性を与えることもできる。具体的には脂質成分は肝臓に貯まりやすいことから肝臓の選択的な造影を目的とする場合には、PEG を使用しないか、あるいは PEG 含有量の少ないリポソームを用いるのがよい。また粒径を 200nm 以上に大きくすると、肝臓 Kupffer 細胞の食作用により速やかに取り込まれる可能性が高くなり、肝臓の該部位に集積する。肝臓癌の撮像においては、その癌組織には正常組織に比べて Kupffer 細胞が少ないために、造影剤リポソームの取込み量は相対的に少なくなり、コントラストが鮮明となる。脾臓においても同様である。

【0041】

反対に他臓器の造影の場合、PEG を導入すればリポソームをステルス化して肝臓などに集まりにくくすることができるため、PEG 化リポソームの使用が推奨される。PEG の導入により水和層が形成されるためにリポソームは安定化し、血中滞留性も向上する。PEG のオキシエチレン単位の長さ、導入する割合を適宜変えることにより、その機能を調節することができる。PEG として、オキシエチレン単位が 10~3500 のポリエチレングリコールが好適である。また PEG を使用する場合の使用量は、該リポソームを構成する脂質に対して 0.1~30 質量%、好ましくは 1~15 質量%程度含むのがよい。

【0042】

リポソームの PEG 化は、公知の技術を利用することができる。PEG が結合するアンカー (たとえばコレステロールなど) を膜構成成分であるリン脂質と混ぜてリポソームを作製し、そのアンカーに活性化 PEG を結合させてもよい。なお、リポソーム表面に導入されたポリエチレングリコール基は「機能性物質」と反応しないため、そうしたりリポソーム表面上に「機能性物質」を固定化することは困難である。代わりに PEG 先端に何らかの修飾をさらに施した PEG をリン脂質に結合させ、これをリポソーム構成成分として含めてリポソームを作製することもできる。

【0043】

上記 PEG に代わり、公知の各種ポリアルキレンオキシド基、 $-(AO)_n-Y$  をリポソーム表面に導入してもよい。ここで AO は炭素数 2~4 のオキシアルキレン基を表し、 $n$  はオキシアルキレン基の平均付加モル数で、1~2000 の正数である。Y は、水素原子、アルキル基または機能性官能基を表す。

【0044】

炭素数 2～4 のオキシアルキレン基 (AO で表される) として、たとえば

オキシエチレン基、オキシプロピレン基、オキシトリメチレン基、オキシテトラメチレン基、オキシ-1-エチルエチレン基、オキシ-1, 2-ジメチルエチレン基などが挙げられる。これらのオキシアルキレン基は、エチレンオキシド、プロピレンオキシド、オキセタン、1-ブテンオキシド、2-ブテンオキシド、テトラヒドロフランなどのアルキレンオキシドを付加重合させた基である。

【0045】

n は 1～2000、好ましくは 10～500、さらに好ましくは 20～200 の正数である。

【0046】

n が 2 以上の場合、オキシアルキレン基の種類は、同一のものでも異なるものでもよい。後者の場合、ランダム状に付加していても、ブロック状に付加していてもよい。ポリアルキレンオキシド鎖に親水性を付与する場合、AO としてはエチレンオキシドが単独で付加したものが好ましく、この場合、n が 10 以上のものが好ましい。また種類の異なるアルキレンオキシドを付加する場合、エチレンオキシドが 20 モル%以上、好ましくは 50 モル%以上付加しているのが望ましい。ポリアルキレンオキシド鎖に親油性を付与する場合はエチレンオキシド以外の付加モル数を多くする。

【0047】

Y は、水素原子、アルキル基または機能性官能基である。アルキル基として、炭素数 1～5 の、分岐していてもよい脂肪族炭化水素基が挙げられる。機能性官能基は、ポリアルキレンオキシド鎖の先端に糖、糖タンパク質、抗体、レクチン、細胞接着因子といった「機能性物質」を付するためのもので、たとえばアミノ基、オキシカルボニルイミダゾール基、N-ヒドロキシコハク酸イミド基といった反応性に富む官能基が挙げられる。

【0048】

先端に「機能性物質」を結合しているポリアルキレンオキシド鎖が固定化されたりリポソームでは、ポリアルキレンオキシド鎖導入の効果に加えて、ポリアルキレンオキシド鎖に邪魔されることなく「機能性物質」の機能、たとえば「認識素子」として特定臓器指向性、癌組織指向性などの作用が十分に発揮される。

【0049】

ポリアルキレンオキシド基を有するリン脂質または化合物は、一種類を単独で使用する事ができ、あるいは二種以上のものを組み合わせて使用することもできる。その含有量は、リポソーム膜形成成分の合計量に対し、0.001～50モル%、好ましくは0.01～30モル%、より好ましくは0.1～10モル%である。0.001モル%未満では期待される効果が小さくなる。

【0050】

リポソームへのポリアルキレンオキシド鎖の導入は、公知の技術を利用することができる。ポリアルキレンオキシドが結合するアンカー (たとえばコレステロールなど) を膜構成成分であるリン脂質と混ぜてリポソームを作製し、そのアンカーに活性化ポリアルキレンオキシドを結合させてもよい。このような方法では、リポソーム調製後にリポソーム膜表面上で多段階の化学反応を行う必要があり、このため目的とする「機能性物質」の導入量が低く制限され、また反応による副生成物や不純物が混入し、リポソーム膜へのダメージが大きいなどの問題点がある。

【0051】

一方好ましい製造方法として、原料のリン脂質類の中に、予めリン脂質ポリアルキレンオキシド (PEO) 誘導体などを含めてリポソームを作製するのがよい。これには、ホスファチジルエタノールアミンなどのポリエチレンオキシド (PEO) 誘導体、たとえばジステアロイルホスファチジルエタノールアミンポリエチレンオキシド (DSPE-PEO) などといった修飾リン脂質が提案された (特開平 7-165770 号公報)。さらに特開 2002-37883 号公報には、血中滞留性を高めた水溶性高分子修飾リポソームを作製するための高純度ポリアルキレンオキシド修飾リン脂質が開示されている。リポソ

ームを作製する際にモノアシル体含量が低いポリアルキレンオキシド修飾リン脂質を使用すると、リポソーム分散液の経時安定性が良好であったことが記載されている。

#### 【0052】

リポソームを作製する方法として、これまでに種々の方法が提案されている。作製方法が異なると、最終的に出来上がったリポソームの形態および特性もまた著しく異なることが多い（特開平6-80560号公報）。そのため所望するリポソームの形態、特性に応じてその製造方法を適宜選択することが行なわれている。一般にリポソームは、リン脂質、ステロール、レシチンといった脂質成分をほとんど例外なく、まず有機溶媒、たとえばクロロホルム、ジクロロメタン、エチルエーテル、四塩化炭素、酢酸エチル、ジオキサン、THFなどととも容器中で溶解、混合することにより調製されている。揮発性物質を減圧下で蒸発せしめた後、脂質混合物を、所定量の封入物質を含有する緩衝液中に分散させる。次いで全体を数時間攪拌し（これがリポソームの形成を引き起こす）、そうして生成したリポソーム小胞内にその分散液の一部（封入物質を含む）を封入する。次に分散液を超音波処理によるか、界面活性化剤の使用による方法、あるいはその他の諸々の方法でそれらリポソームのサイズおよび分散液の粘度を減少させる。このようなリポソームの調製品は、必ず有機溶媒を含んでいる。そうした残留する有機溶媒、特にクロル系有機溶媒は完全に除去することが困難であり、生体に及ぼす悪影響が懸念される。

#### 【0053】

本発明に使用するリポソームを調製するには、上記の問題点を回避できる超臨界もしくは亜臨界二酸化炭素を使用するリポソーム調製法を利用する。二酸化炭素の臨界温度が31.1℃、臨界圧力が73.8 barと比較的扱いやすく、不活性なガスゆえ残存しても人体に無害であり、高純度流体が安価で容易に入手できるなどといった理由により好適である。さらにこの方法により作製されたリポソームは、後記するようにX線造影剤のヨウド化合物を内包するのに種々の好ましい特性および利点を有している。

#### 【0054】

超臨界もしくは亜臨界二酸化炭素を使用してリポソームを作製する場合、上記脂質膜成分を、超臨界状態（亜臨界状態を含む）にある二酸化炭素に溶解、分散または混合することが必要となる。かかる超臨界二酸化炭素は、物質中に浸透しやすいため溶解性に優れている。その際、低級アルコール、グリコール、グリコールエーテルなどのアルコールを助溶媒として1種または2種以上併用することは、上記脂質膜成分の溶解性が一層向上するために望ましい。たとえばアルコール類を超臨界二酸化炭素の0.1~10質量%、好ましくは、1~8質量%の割合で助溶媒として使用するのがよい。このうち、より好ましい溶解助剤は、安全性の観点および除去の容易性からエタノールである。

#### 【0055】

本発明の製造方法で使用する超臨界状態（亜臨界状態を含む）の二酸化炭素の好適な圧力は、50~500kg/cm<sup>2</sup>、好ましくは100~400 kg/cm<sup>2</sup>である。また好適な臨界状態の二酸化炭素ガスの温度としては、25~200℃、好ましくは31~100℃、さらに好ましくは35~80℃である。これらの範囲内で、温度および圧力を適宜選択して組み合わせることにより、超臨界状態（亜臨界状態を含む）を確立するのがよい。

#### 【0056】

本発明のX線造影剤に使用するリポソームの好適な調製方法は、具体的には以下のように行なわれる。リポソーム膜成分の存在下で、液体二酸化炭素を加え上記の好適な圧力および温度のもとにある超臨界状態もしくは亜臨界状態にする。膜脂質成分としてポリアルキレンオキシド修飾リン脂質、ポリアルキレンオキシド基を有する化合物、ポリエチレングリコール基を有する化合物、ステロール類から少なくとも1種選ばれた化合物とともに、上記リン脂質を添加して、攪拌下、溶解する。その際、必要に応じて上記溶解助剤を併用することができる。続いてヨウド系化合物および後述の製剤助剤（たとえば水溶性アミン系緩衝剤およびキレート化剤）を含む水溶液を連続的に添加して、水相/二酸化炭素エマルジョンを形成する。このエマルジョン系において脂質成分はミセル状となり離合集散をしていると推定される。しばらく攪拌を続行してミセルを含むエマルジョンが安定化し

た後に、さらに二酸化炭素相と水相とが分離するまで水を連続的に添加する。水相の増大とともに系の相転移が起こり、水/炭酸ガスエマルジョン+炭酸ガス/水エマルジョンの2相系を経て、過剰な炭酸ガスが炭酸ガス/水エマルジョンと分離すると考えられる。リポソームは水相に転相していると推定される。系内を減圧して二酸化炭素を排出すると、ヨウド系化合物を内包するリポソームが分散している水性分散液が生成する。この場合、該リポソームの膜内部以外の水相（すなわち該リポソームが分散されている水性媒体）にも少なくともヨウド系化合物の他に、製剤助剤（たとえば水溶性アミン系緩衝剤およびキレート化剤）が含まれている。リポソーム膜内部にも上記水溶液が封入されているため、ヨウド系化合物および製剤助剤はリポソーム外部の水性媒体のほか、実質的に同一濃度でリポソーム内部の水相に存在し、いわゆる「内包」の状態にある。さらに該リポソームを0.1~0.4 $\mu$ の孔径を有する濾過膜を通す。次いで、必要に応じた滅菌処理、パッケージングなどの製剤過程を経て、本発明のX線検査用造影剤が調製される。

#### 【0057】

超臨界もしくは亜臨界二酸化炭素を使用するリポソーム調製法は、従来法に比べてリポソームの生成率、封入する物質の内包率、封入物質のリポソーム内残存率が高いことが示されている（上記特許文献2参照）。さらに工業的スケールでの応用も可能であり、実質的に有機溶剤を使用せずに非イオン性かつ水溶性の物質を効率よくリポソームに封入することができる本法は、本発明のX線造影剤の製造に有用な方法である。

#### 【0058】

本発明のX線検査用造影剤では、後述するようにヨウド系化合物を、保持安定性の観点から、リポソーム膜脂質重量に対して適切な重量比でリポソーム内に封入している。さらにリポソーム中の造影物質の保持安定性は、リポソームが通常50~300nmの中心粒径であり、実質的に1枚膜であることによっても図られている。1枚膜のリポソームは、実質的にリン脂質二重層が1つの層としてなる膜（unilamellar vesicle）で構成されるリポソームである。ここで「実質的に」とは、以下の凍結かつ断（Freeze fracture）レプリカ法による透過型電子顕微鏡（TEM）観察において、レプリカが概ね1つの層として認められるリン脂質二重層によりリポソームが構成されていることをいう。すなわち、観察したカーボン膜に残された粒子の跡について段差がないものを一枚膜と判定し、2つ以上の段差が認められるものを「多層膜」と判定した。本発明のX線造影剤において、このような1枚膜リポソームを、造影剤中に含まれる全リポソーム量のうち、少なくとも80%、好ましくは90%以上含むものである。

#### 【0059】

このような一枚膜リポソームは、脂質類の溶媒として上記超臨界二酸化炭素を使用し、水による相分離方法により効率よく作製できる。これに対し、従来のリポソーム作製方法では、多重層膜（multilamellar vesicles; MLV）からなるリポソームがかなりの割合で存在することが多い。そのため、一枚膜リポソームの比率を高めるためには、超音波を照射するか、一定孔サイズのフィルターに通すなどの操作をさらに必要としていた。1枚膜リポソームは、MLVと比較して、リポソームの投与量、換言すると投与脂質量が大きくなるという利点もある。

#### 【0060】

一枚膜リポソーム、特に大きい一枚膜リポソームであるLUV（Large unilamellar vesicles）は、多重層リポソームに比べて、大きい封入容量を提供するという利点がある。本発明の造影剤に使用するリポソームは、粒径が200~1000nmのLUVと、粒径が50nm未満の小さい一枚膜リポソームであるSUV（Small unilamellar vesicles）との中間に位置する。このため、保持容積もSUVより大きくなり、ヨウド系化合物、特に水溶性ヨウド系化合物のトラップ効率、換言すると内包効率も、後述するように格段に優れたものとなる。また、MLV、LUVと違い、細網内皮系細胞に取り込まれて急速に血流から消失することもない。

#### 【0061】

リポソーム粒子のサイズおよびその分布は、本発明のX線造影剤が目指す、高い血中滞

留性、ターゲティング性、送達効率と密接に関わっている。粒径はヨウド化合物を内包するリポソームを含む分散液を凍結し、その後破碎した界面をカーボン蒸着し、このカーボンを電子顕微鏡で観察すること（凍結破碎TEM法）により測定することができる。ここで「中心粒径」とは、粒子分布で最も出現頻度の高い粒径を指している。粒径の調整は、処方またはプロセス条件で行なうことができる。たとえば、上記の超臨界の圧力を大きくすると形成されるリポソーム粒径は小さくなる。作製するリポソームの粒径分布をより狭い範囲に揃えるには、ポリカーボネート膜で濾過してもよい。この場合、濾過膜として0.1~0.4 $\mu$ の孔径のフィルターを装着したエクストルーダーに通すことにより、1枚膜の中心粒径として100~300nm以下である最適寸法のリポソームを効率よく調製することができる。押出しろ過法については、たとえばBiochim. Biophys. Acta 557巻, 9ページ(1979)に記載されている。このような「押出し」操作を取り入れることにより、上記サイジングに加えて、リポソーム外に存在するヨウド系化合物の濃度の調整、リポソーム分散液の交換、望ましくない物質の除去も併せて可能になるという利点もある。

#### 【0062】

上記のように受動的ターゲティング能力をリポソームに持たせるには、その粒径のサイジングが重要である。特2619037号公報には、粒径3000nm以上のリポソームを排除することにより、肺の毛細血管における不都合な保持が回避されると記載されている。しかし、150~3000nmの粒径範囲のリポソームは、必ずしも向腫瘍性とはならない。

#### 【0063】

本発明の造影剤リポソームの中心粒径は、通常50~300nm、好ましくは50~200nm、より好ましくは50~130nmである。X線撮像の目的に応じて、粒径を適切に設定することができる。たとえば腫瘍部分の選択的撮像目的の場合には、特に110~130nmが好ましい。リポソームの粒径を100~200nm、より好ましくは110~130nmの範囲に揃えることにより癌組織へ選択的にX線造影剤を集中させることが可能となる。これは「EPR効果」として知られている。固形癌組織にある新生血管壁の孔は、正常組織の毛細血管壁窓（fenestra）の孔サイズ、30~80nm未満に比べて異常に大きく、約100nm~約200nmの大きさの分子でも血管壁から漏れ出る。すなわちEPR効果は、癌組織にある新生血管壁では、正常組織の微小血管壁より透過性が高いことによるものである。

#### 【0064】

血管壁の孔から漏れ出た造影剤は、癌細胞の周辺にはリンパ管が十分に発達していないため、血管に再び戻らずその場に長く留まる。EPR効果は、血流を利用する受動的な輸送であることから、それが有効に発現するための要件として、血中滞留性の向上が図られねばならない。つまり造影剤粒子（ヨウド化合物を内包するリポソーム粒子）が、血中に長くとどまって、癌細胞近くの血管を何度も通過することが求められる。本発明のX線造影剤は、特に大きい粒子でもないため、細網系内皮細胞による捕獲の対象になりにくい。またリポソームがいわば赤血球類似の姿と挙動をしていて腎臓を経由して速やかに排出されることはなく、さらにステルス（隠蔽）化されている場合には細網系内皮細胞に貪食されることもなく、血流中に比較的長くとどまる。EPR効果により、必然的に標的の臓器、組織への造影化合物の移行性が高まり、造影剤の癌組織への選択的集中と蓄積が達成される。造影化合物の腫瘍細胞／正常細胞集積比の上昇は、X線造影剤のコントラスト性能を高める。このような腫瘍描出性の改善は、これまで検出困難であった微小転移性癌の発見すらも可能とする。

#### 【0065】

##### X線検査用造影剤

本発明のX線検査用造影剤において、リポソームによる造影物質の保持効率は、リポソームの構造安定性の向上ならびに造影物質の保持安定性の向上を通じて改善されている。

#### 【0066】

本発明造影剤は、上記リポソームの膜内部の水相とそのリポソームが分散されている水性媒体との両方に、少なくともヨウド化合物および製剤助剤を含有し、該膜内外でそれぞれの濃度が実質的に同一である。ここで「実質的に」とは、通常の場合ほとんど濃度が同

一であることをいう。

【0067】

「製剤助剤」として、製剤化に際し、造影物質とともに添加されるものであり、これまでの造影剤製造技術に基づいて各種の物質が使用される。具体的には生理学的に許容される各種の緩衝剤、EDTANa<sub>2</sub>-Ca、EDTANa<sub>2</sub>などのキレート化剤、さらに必要に応じて、浸透圧調節剤、安定化剤、抗酸化剤として $\alpha$ -トコフェロール、粘度調節剤などが挙げられる。好ましくは、水溶性アミン系緩衝剤およびキレート化剤をとともに含める。pH緩衝剤としては、アミン系緩衝剤および炭酸塩系緩衝剤が好ましく用いられるが、さらに好ましくはアミン系緩衝剤であり、中でもトロメタモールが望ましい。キレート化剤は好ましくは、EDTANa<sub>2</sub>-Caである。

【0068】

また、水性媒体とは、ヨウド化合物、製剤助剤などを溶解する水をベースとする溶媒である。

【0069】

リボソームの膜内部の水相（封入された水溶液）以外の水溶液（すなわち該リボソームが分散されている水性媒体）にも少なくともヨウド系化合物の他に、製剤助剤（たとえば水溶性アミン系緩衝剤、キレート化剤など）が含まれている。したがって、該膜内外で著しい浸透圧差は生じることはなく、これによりリボソームの構造安定性が維持される。

【0070】

X線造影剤のコントラスト性能を規定する、標的臓器への必要なヨウ素送達量は、明らかにされている（たとえば特許2619037号公報）。本発明のようにヨウド系化合物をリボソームというマイクロキャリアに封入する場合には、造影物質の送達効率および保持安定性に加えて脂質の用量も考慮されねばならない。脂質量が多くなると造影剤の粘度が大きくなる。リボソーム内へのヨウド系化合物の封入量については、リボソーム内に封入された水溶液中にヨウド系化合物が、リボソーム膜脂質重量に対して、1~10、好ましくは3~8、より好ましくは5~8の重量比で含有されていることが望ましい。

【0071】

リボソーム内の水相へカプセル化されたヨウド系化合物の重量比が1未満であると、比較的多量の脂質を注入することが必要となり、結果的に造影物質の送達効率が悪くなる。特許2619037号公報の記載によると、当該比が1でも当時の技術水準からは高い値とされていた。X線造影剤の粘度は、リボソームの脂質量にも左右されるため、保持容積および内包効率に優れる一枚膜リボソームの優位性は明らかである。反対に、リボソーム膜脂質重量に対するヨウド系化合物の封入重量比が10を超えると、リボソームが構造的にも不安定となり、リボソーム膜外へのヨウド系化合物の拡散、漏出は貯蔵中または生体内に注入された後でも避けられない。またリボソーム懸濁薬剤が製造され、単離した直後は100%の封入が達成されても、浸透圧効果による不安定化に基づいて、早くも短時間に封入成分が減少していくことが記載されている（特表平9-505821号公報）。

【0072】

本発明の方法により製造されるX線検査用造影剤は、ヨウド含有量として、通常、想定される10~300mlの製剤溶液の投与量では、100~500mgI/mlであり、好ましくは、150~300mgI/mlである。また本発明の製剤溶液の粘度は、37℃で、6cPa以下、好ましくは0.9~3cPaである。

【0073】

本発明の造影剤は、投与後にリボソームが体内に安定に維持されるように、体内の浸透圧に対し、等張の溶液または懸濁液の形でリボソーム中に封入される。そうした溶液もしくは懸濁液の媒質として、水、緩衝液、たとえばトリス-塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液などを使用することができる。

【0074】

上記溶液もしくは懸濁液の好ましいpH範囲は、室温で6.5~8.5、さらに好ましくは6.8~7.8である。X線造影剤が多ヒドロキシル基を有する水溶性ヨウド系化合物である場合

、好ましい緩衝液は、米国特許第4278654号に記載されているような負の温度係数を有する緩衝液である。アミン系緩衝液はこのような要求を満たす性質を有しており、特に好ましくはトリス（トロメタモール）である。このタイプの緩衝液は、オートクレーブ温度で低いpHを有し、このことがオートクレーブ中のX線造影剤の安定性を増し、他方、室温では生理的に許容されるpHに戻る。この場合、ろ過滅菌のようにリポソーム粒径の微小化という制約も受けない。したがって、注射用無菌造影剤を製造するために、リポソーム調製物をオートクレーブ滅菌できることは極めて便利であり、貯蔵安定性なども確保できる。しかしオートクレーブ滅菌を適用できないリポソームには、ろ過滅菌を行なうのがよい。

#### 【0075】

等張の溶液または懸濁液を得るには、等張液を提供する濃度で、造影剤を媒質中に溶解もしくは懸濁させる。たとえば造影剤化合物の溶解性が低いために造影剤が単独では等張液を提供できない場合、等張の溶液もしくは懸濁液が形成されるように他の非毒性の水溶性物質、たとえば塩化ナトリウムのごとき塩類、マンニトール、グルコース、ショ糖、ソルビトールなどの糖類を水性媒体中に添加してもよい。

#### 【0076】

以上より、特に腫瘍描出性およびリポソームの造影物質の保持効率が改善されたより好ましい実施態様の一例は、

脂質膜にポリアルキレンオキシド鎖および／またはステロールを有し、中心粒径が50～200nmである1枚膜リポソームを含み、該リポソームがヨウド系化合物を脂質膜重量に対して3～8の重量比で含有しており、かつ、リポソーム内に封入されたヨウド化合物が全ヨウド化合物の5～25質量%であることを特徴としているX線検査用造影剤である。さらに、リポソームの膜内部の水相とそのリポソームが分散されている水性媒体との両方に、少なくともヨウド化合物および製剤助剤を含有し、該膜内外でそれぞれの濃度が実質的に同一であることが望ましい。

#### 【0077】

本発明のX線検査用造影剤は、注射剤または点滴注入剤として、非経口的に、具体的には血管内投与、好ましくは静脈内投与により被験者に投与されX線照射により撮像される。その用量は、従来のヨウド系造影剤に準じる。リポソーム内のヨウド総量、またはそれとリポソーム外のヨウド総量の和が、従来の投与量と同程度になるようにしてもよい。

#### 【0078】

本発明のX線検査用造影剤は、リポソームの膜内部の水相とそのリポソームが分散されている水性媒体との両方に、少なくともヨウド化合物および製剤助剤を含有しており、該膜内外ではそれぞれの濃度が実質的に同一である。このことは、同一ヨウド化合物が、同一X線検査用造影剤中で、異なる存在形態で共存していることを意味する。このような造影物質の態様は、診断的検査において次のような有利な場合があることを指摘できる。すなわち、本発明のX線検査用造影剤を用いることにより、カプセル化されていない造影物質とリポソーム内にカプセル化された造影物質との体内拡散時間の違いが、経時的に分布挙動の異なった画像を与えて診断上の有益な情報を提供することがある。

#### 【0079】

実際の診断的検査においては、本発明のX線検査用造影剤を、コンピュータ断層撮影装置（CT）と組み合わせたX線撮影装置に使用することにより、その造影剤性能をさらに有効に発揮することも期待される。たとえば肝臓腫瘍をコンピュータ断層撮影（CT）診断する場合、投与直後にリポソーム内にカプセル化されていない造影物質は、肝臓類洞の間隙を自由に通過して肝臓実質細胞に到達し、まず健康な肝臓組織の画像濃度が上昇するが、これは急速に低下する。この濃度低下は引き続いて同時に起こるリポソーム造影剤からの補強により補償されて長時間にわたり造影物質の高濃度が維持される。この遊離した非カプセル化造影物質が分布挙動に差異を示すことから、組織状態についての詳細な分析が可能となる。

#### 【発明の効果】

**【0080】**

本発明に係る X 線造影剤は、中心粒径を揃えた 1 枚膜リポソームを含み、リポソームの膜内部の水相とそのリポソームが分散されている水性媒体との両方に、少なくともヨウド化合物および製剤助剤を含有している。該膜内外でそれぞれの濃度が実質的に同一であることから、リポソーム構造の安定化および封入物質の保持安定性を改善させている。

**【0081】**

本発明造影剤の造影物質は血中滞留性が良好であり、EPR 効果が発揮され、その結果、目的とする疾患部位または組織、とりわけ癌組織に選択的に集中し蓄積する。造影後は、該ヨウド化合物が水溶性であるため、いずれ体外へ排泄される。さらにカプセル化されていない造影物質とリポソーム内にカプセル化された造影物質との体内拡散時間の違いが、経時的に分布挙動の異なった画像を与えて診断上の有益な情報を提供する。

**【0082】**

上記リポソームの製造は、リン脂質などを超臨界二酸化炭素に溶解して作製する方法を採用するため、有毒な溶媒、特に毒性の高いクロル系溶媒を使用する必要がない。

**【0083】**

本発明に係る X 線造影剤は、従来の X 線造影剤に比べて使用量が少量で済み、毒性、副作用がはるかに軽減されている。したがって、その投与を受ける患者の負担は少ない。

**【発明を実施するための最良の形態】****【0084】****〔実施例〕**

以下、本発明を実施例に基づいてさらに具体的に説明する。本発明は、かかる実施例によりなんら限定されるものではない。

**〔試験〕****リポソームの形態および粒径**

調製した造影剤中のリポソームの粒径および構造を凍結破碎法により透過型電子顕微鏡 (TEM) で調べた。すなわち、リポソーム分散液を液体窒素にて急速に凍結し、凍結状態で破碎してリポソームの内部構造を露出させる。破碎面をカーボン蒸着し、形成されたカーボン膜を透過型電子顕微鏡で観察した。

**【0085】**

粒径は、観察された造影剤粒子約 20 個の径の単純平均とした。リポソーム粒子の構造は、観察したカーボン膜に残された粒子の跡について段差がないものを「一枚膜」と判定し、2 つ以上の段差が認められるものを「多層膜」と判定した。約 20 個の粒子を観察し、一枚膜構造のものが 8 割以上であるものを実質的に一枚膜リポソームと判定した。

**ヨウド化合物のヨウドの定量**

リポソーム分散液を等張の食塩水で透析し、透析終了後にエタノールを添加してリポソームを破壊して、吸光度の測定によりリポソーム内のヨウド化合物量を求めた。

**【実施例 1】****【0086】**

ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) 0.032g、コレステロール 0.008g およびアデカ社製ブルニック F-88 (ポリエチレンオキシドとポリプロピレンオキシドのブロック共重合体) 1.2mg、エタノール 0.9g の混合物をステンレス製オートクレーブに仕込み、オートクレーブ内を 60℃ に加熱し、次いで液体二酸化炭素 13g を加えた。オートクレーブ内の圧力を 50kg/cm<sup>2</sup> から 200kg/cm<sup>2</sup> にまで加圧し、オートクレーブ内を攪拌して、超臨界二酸化炭素中に DPPC を溶解させた。この超臨界二酸化炭素溶液を攪拌しながら、イオヘキソール溶液 647mg/mL (ヨウド含有率 300mg/mL)、トロメタモールを 1.21mg/mL、エデト酸カルシウム 2 ナトリウム (EDTANa<sub>2</sub>-Ca) 0.1mg/mL を含有し、適量の塩酸および水酸化ナトリウムで pH を 7 前後に調整した溶液 5g を定量ポンプで連続的に注入した。その後系内を減圧して二酸化炭素を排出し、イオヘキソールを含有するリポソームの分散液を得た。得られた分散液を 60℃ まで加熱し、アドバンテック社製のセルロース系フィルター、0.1μm で加圧濾過した。得られた造影剤を試料 1 とした。



## 【0087】

上記方法により求めた試料1中のリポソームの粒径は120nmであり、実質的に一枚膜のリポソームであった。上記試料の脂質重量に対するリポソーム内に内包されているヨウド化合物のヨウド量の比は、3.7であり、全ヨウド化合物のうち、リポソーム内のヨウド化合物の比率は、23質量%であった。

## 【0088】

圧力を高圧側に調整すること、減圧速度を調整すること、セルロース系フィルター、0.1 $\mu$ m、0.2 $\mu$ mおよび0.4 $\mu$ mを使用し、使用リン脂質量を変更した以外は、試料1の場合と同様にすることによりリポソームの分散液を得て、これらを試料2～7とした。試料2～7中のリポソームは、実質的に一枚膜のリポソームであった。これらの試料のリポソーム粒径、脂質重量に対するリポソーム内に内包されているヨウド化合物のヨウド量の比、全ヨウド化合物に対するリポソーム内のヨウド化合物の比率を表1に示す。

## 【0089】

さらにジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) 0.024gおよびコレステロール0.006gを用いて、圧力および減圧速度を調整した以外は、試料1の場合と同様にすることにより、試料8を作製した。

## 【0090】

また、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) 0.048gおよびコレステロール0.012gを用いて、圧力および減圧速度を調整した以外は、試料1の場合と同様にすることにより、試料9を作製した。

## 【0091】

試料8および9中のリポソームは実質的に一枚膜のリポソームであった。これらの試料のリポソーム粒径、脂質重量に対するリポソーム内に内包されているヨウド化合物のヨウド量の比、全ヨウド化合物に対するリポソーム内のヨウド化合物の比率を表1に示す。

## 【0092】

エデト酸カルシウム2ナトリウム (EDTANa<sub>2</sub>-Ca) を使用しないこと以外は、試料1～9の場合と同様にして試料11～19を作製した。試料11～19中のリポソームは実質的に一枚膜のリポソームであった。これらの試料のリポソーム粒径、脂質重量に対するリポソーム内に内包されているヨウド化合物のヨウド量の比、全ヨウド化合物に対するリポソーム内のヨウド化合物の比率を表1に示す。これによると、エデト酸カルシウム2ナトリウムを使用した場合とほぼ同一であった。

## 【0093】

トロメタモールを使用しない以外は、試料1～9の場合と同様にして試料21～29を作製した。試料11～19中のリポソームは実質的に一枚膜のリポソームであった。これらの試料のリポソーム粒径、脂質重量に対するリポソーム内に内包されているヨウド化合物のヨウド量の比、全ヨウド化合物に対するリポソーム内のヨウド化合物の比率を表1に示す。これによると、トロメタモールを使用した場合とほぼ同一であった。

## 【0094】

試料1～9、11～19、21～29について、得られたリポソーム分散液を等張の食塩水で透析し、リポソームが分散されている水性媒体のヨウド化合物と製剤助剤の濃度を、リポソーム膜内の水相の濃度より下げた比較試料101～109、111～119、121～129を作製した。これらの試料のリポソーム粒径、脂質重量に対するリポソーム内に内包されているヨウド化合物のヨウド量の比、全ヨウド化合物に対するリポソーム内のヨウド化合物の比率を表1に示す。

## 【実施例2】

## 【0095】

## 安定性評価

試料を生理食塩水中に添加し、密閉後、42℃に加温して14日間放置した。得られたサンプルおよび加熱前の試料を光学顕微鏡で観察した。

加熱前の試料はすべて光学顕微鏡で微粒子が観察されなかったが、加熱後は、一部の試料

については、リポソーム粒子の合一と見られる数 $\mu$ の微粒子が観察された。安定性を次の基準で評価した。すなわち、

- 5: 合一粒子なし
- 4: 合一粒子がごく僅かにある。
- 3: 合一粒子が明らかに観察される。
- 2: 合一粒子が多い。
- 1: 合一粒子が極めて多い。

結果を表1に示す。

【実施例3】

【0096】

造影性評価

実施例1で得た試料を等張グルコース液で希釈して、50mgヨウ素/mlの濃度とした。家兎の皮下にVX2カルシノーマの細胞浮遊液を移植した。移植2週間後に、前記試料液を静脈内注射し、注射後にX線画像で観察した。移植部分の造影レベルを経時で測定して、造影性低下の速度および造影強度を、リポソーム化していない造影剤と比較して観察した。この場合、造影強度が強く、造影性の低下速度が遅いほど望ましい造影剤である。結果を表1に示す。空欄は、本評価を行わなかったことを示す。

【0097】

表1から明らかなように、粒径が200nmを超えると造影効果は小さくなる。また、リポソーム内外の水溶性成分に差があると安定性は低下する。また0.1~0.4 $\mu$ の孔径を有する濾過膜を通した試料は、同じ中心粒径でも分散安定性が向上する。

【0098】

反対に、リポソーム内外の水溶性成分に差がない場合、水溶性アミン系緩衝剤やキレート化剤が存在するとさらに安定性が向上する。特に、リポソーム内のヨウド化合物が全ヨウド化合物の25%以下の場合、またはヨウド化合物が脂質膜重量の25%以下のときに安定化効果が顕著である。

【0099】

【表 1】

表 1

試料no.	リボソーム内 外温度差	0.1~0.4μm 径濾過膜処 理	粒径	リボソーム内 比対脂質	リボソーム内 1%対全1	安定性	造影性	備考
1	なし	なし	120	3.7	23	4		本発明例
2	なし	あり	70	3.4	21	5		本発明例
3	なし	あり	95	3.2	20	5		本発明例
4	なし	あり	120	3.8	24	5	強度大,速度低下大	本発明例
5	なし	あり	150	3.7	23	5	強度中,速度低下大	本発明例
6	なし	あり	180	4.0	25	5	強度中,速度低下中	本発明例
7	なし	あり	210	3.9	24	5	強度小	比較例
8	なし	あり	120	6	28	5	強度大,速度低下大	本発明例
9	なし	あり	120	2.5	23	5	強度中,速度低下大	本発明例
11	なし	なし	120	3.7	23	4		本発明例
12	なし	あり	70	3.4	21	5		本発明例
13	なし	あり	95	3.2	20	5		本発明例
14	なし	あり	120	3.8	24	5		本発明例
15	なし	あり	150	3.7	23	5		本発明例
16	なし	あり	180	4.0	25	4		本発明例
17	なし	あり	210	3.9	24	5		比較例
18	なし	あり	120	6	28	4		本発明例
19	なし	あり	120	2.5	23	4		本発明例
21	なし	なし	120	3.7	23	4		本発明例
22	なし	あり	70	3.4	21	4		本発明例
23	なし	あり	95	3.2	20	4		本発明例
24	なし	あり	120	3.8	24	4		本発明例
25	なし	あり	150	3.7	23	4		本発明例
26	なし	あり	180	4.0	25	4		本発明例
27	なし	あり	210	3.9	24	4		比較例
28	なし	あり	120	6	28	4		本発明例
29	なし	あり	120	2.5	23	4		本発明例
101	あり	なし	120	3.7	23	2		比較例
102	あり	あり	70	3.4	21	3		比較例
103	あり	あり	95	3.2	20	3		比較例
104	あり	あり	120	3.8	24	3		比較例
105	あり	あり	150	3.7	23	3		比較例
106	あり	あり	180	4.0	25	3		比較例
107	あり	あり	210	3.9	24	2		比較例
108	あり	あり	120	6	28	2		比較例
109	あり	あり	120	2.5	23	3		比較例
111	あり	なし	120	3.7	23	2		比較例
112	あり	あり	70	3.4	21	3		比較例
113	あり	あり	95	3.2	20	3		比較例
114	あり	あり	120	3.8	24	3		比較例
115	あり	あり	150	3.7	23	3		比較例
116	あり	あり	180	4.0	25	2		比較例
117	あり	あり	210	3.9	24	2		比較例
118	あり	あり	120	6	28	2		比較例
119	あり	あり	120	2.5	23	3		比較例
121	あり	なし	120	3.7	23	1		比較例
122	あり	あり	70	3.4	21	2		比較例
123	あり	あり	95	3.2	20	2		比較例
124	あり	あり	120	3.8	24	2		比較例
125	あり	あり	150	3.7	23	2		比較例
126	あり	あり	180	4.0	25	1		比較例
127	あり	あり	210	3.9	24	1		比較例
128	あり	あり	120	6	28	1		比較例
129	あり	あり	120	2.5	23	2		比較例

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

リポソームの安定化とヨウド化合物の保持安定性を図るとともに造影化合物の血中滞留性を高め、造影剤の効率的送達および良好なターゲティングを達成する、安全性の高いX線造影剤を提供することを目的とする。

【解決手段】

中心粒径が50～200nmであるリポソームを含み、該リポソームが実質的に1枚の脂質膜を有し、該膜内の水相と該リポソームが分散されている水性媒体との両方にヨウド系化合物および製剤助剤（少なくとも水溶性アミン系緩衝剤および／またはキレート剤）を含有し、該膜内外でそれぞれの濃度が実質的に同一であることを特徴とするX線検査用造影剤である。該リポソームに封入されたヨウド系化合物は、全ヨウド系化合物の5～25%で含まれ、脂質膜重量に対して3～8の重量比で含有されている。本発明のX線検査用造影剤は、超臨界二酸化炭素法により作製されるためクロル系溶剤などの有毒な溶剤を含まないため安全性が高い。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 3 9 2 6 7 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 3 0 3 0 0 0 4 2 0 ]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 1 0 月 1 日

[変更理由]

名称変更

住 所

東京都新宿区西新宿1丁目26番2号

氏 名

コニカミノルタエムジー株式会社